Drei Verdünnungslösungen zur direkten mikroskopischen Thrombocytenzählung im Vergleich

vorgelegt von
Eberhard Rödel

aus Coburg

1979

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. N. Zöllner

Drei Verdünnugslösungen zur direkten mikroskopischen Thrombocytenzählung im Vergleich

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eberhard Rödel

aus
Coburg

1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Nowy
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	

UNIV. LEIDEN BIBL.

Vorwort

Die Untersuchungen für diese Arbeit wurden in der Zeit von November 1976 bis April 1977 ausgeführt. Damals sind mit Thrombofix und Thrombosol zwei neue Verdünnungslösungen zur direkten mikroskopischen Thrombocytenzählung auf den Markt gekommen, über die es noch keine Untersuchungen gab. Deshalb erschien es notwendig, diese beiden Lösungen mit einer bewährten Methode zu vergleichen.

Ich danke Prof. Dr. med. Nowy für die Anregung zu diesem Thema, den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik der Universität München für ihre Mithilfe bei der statistischen Bearbeitung des Zahlenmaterials.

Einleitung

Die vorliegende Arbeit hat den Vergleich von drei verschiedenen Verdünnungslösungen zur direkten Thrombocytenzählung als Thema. Nachdem sich die indirekte Zählmethode nach FONIO in einem nach PAPPENHEIM gefärbten Blutausstrich als zu ungenau erwiesen hat, wurden verschiedene Methoden zur direkten Thrombocytenzählung in der Zählkammer entwickelt. Diese wurden zum Teil wieder modifiziert, so daß eine große Zahl von sich teilweise nur geringfügig unterscheidenden Angaben zur Ausführung der direkten Zählmethode zu finden ist. DERLATH schätzte bereits 1956 die Zahl der Methoden auf etwa 100 (4). Die ganze Zählprozedur dauert bei diesen Angaben zum Teil relativ lange. So hat man nach neuen Möglichkeiten gesucht, um die Zählung schneller durchführen zu können. Außerdem war man bemüht, die Erkennbarkeit der Thrombocyten im Mikroskop zu verbessern. Von einer idealen Verdünnungslösung wären insgesamt folgende Eigenschaften zu fordern:

1. Durchführung der Zählung in relativ kurzer Zeit,
2. einfache Handhabung mit entsprechend geringer Anfälligkeit für Fehler,
3. vollständige Hämolyse der Erythrocyten,
4. keine Beeinträchtigung der Thrombocyten und damit gute Erkennbarkeit im Mikroskop,
5. Verhindern der Bildung von Thrombocytenaggregaten.

Nun sind in letzter Zeit zwei Verdünnungslösungen auf den Markt gekommen - Thrombofix der Firma Gödecke und Thrombosol der Firma Sarstedt -, die

eine Vereinfachung und Verbesserung der Zählung versprechen. Allerdings existiert zu diesen Lösungen keine Literatur. Dies gab Anlaß, beide Methoden mit einer heute gebräuchlichen zu vergleichen. Als Vergleichslösung diente die 2-prozentige Procainlösung nach DERLATH, wie sie mit einigen Modifikationen im Vorgehen an der Münchner Poliklinik verwendet wird.

Methoden zur Thrombocytenzählung

Die älteste Methode zur Zählung der Thrommbocyten ist die indirekte Zählung nach FONIO. Dabei werden die Thrombocyten in einem nach PAPPENHEIM gefärbten Blutausstrich, der sehr dünn sein muß, in Relation zu den Erythrocyten gezählt. Die Schwankungen, die sich mit dieser Methode ergeben, sind erheblich. AHLHORN gibt sie mit 28 % an (1). Ausserdem ist die Thrombocytenzahl von der Zahl der Erythrocyten abhängig, so daß bei veränderter Erythrocytenzahl sich zwangsläufig die Zahl der Thrombocyten mitverändern muß.

Später gab es die ersten direkten Zählverfahren, bei denen die gefärbten Thrombocyten in der Zählkammer gezählt wurden. Eine solche Methode ist die von JÜRGENS, die sich jedoch für den klinischen Routinebetrieb als zu umständlich erwiesen hat (SIERING, 11).

Aber nach Entwicklung des Phasenkontrastverfahrens wurden mehrere Möglichkeiten beschrieben, mit denen die ungefärbten Thrombocyten gezählt werden konnten.

Als erste solche Methode beschrieben FEISSLY und LÜDIN 1949 die Zählung der Thrombocyten in der Zählkammer unter Verwendung von hypotoner Kokainlösung. Diese Lösung gewährte eine Hämolyse der Erythrocyten ohne die Thrombocyten wesentlich zu beeinträchtigen. Außerdem verhindert das Kokain eine Aggregation der Thrombocyten, so daß sie in einer Zählkammer gezählt werden können. Zum Mischen des Blutes mit der Kokainlösung werden Leukopipetten verwendet. Die Hämolysezeit wird von

verschiedenen Autoren mit 20 bis 30 Minuten angegeben. Danach wird eine THOMA- oder NEUBAUER-Kammer beschickt, und nach 15 Minuten Sedimentationszeit in der feuchten Kammer kann die Zählung erfolgen. Die feuchte Kammer ist notwendig, um ein Austrocknen der gefüllten Zählkammern zu vermeiden. Die Thrombocyten erscheinen als 2 bis 3 um große, kugelförmige schwarze Gebilde. NACHTIGALL weist darauf hin, daß nach 2 Stunden die Thrombocyten in der Pipette anfangen können zu zerfallen, und daß bei verschiedenen Krankheitsbildern die Resistenz der Thrombocyten gegen die Kokainlösung auch unterschiedlich groß ist (6). AHLHORN konnte jedoch noch nach 3 Stunden Aufbewahrung in der feuchten Kammer keine Veränderung der Thrombocytenzahl finden (1). OSTEN verwendet neben der Kokainlösung zusätzlich noch eine Sequestrennatriumlösung, die er zur Konservierung der Thrombocyten einsetzt. Er erhält so höhere Mittelwerte als bei alleiniger Verwendung von Kokainlösung (8). Abschließend ist zu dieser Methode noch zu sagen, daß die Kokainlösung trotz ihres geringen Gehaltes an Kokain dem Betäubungsmittelgesetz unterliegt, und daß deshalb ihre Beschaffung Schwierigkeiten bereiten kann.

Dieses Problem stellt sich bei Verwendung von 1-prozentiger Ammoniumoxalatlösung nicht. 1950 wurde dieses Verfahren von BRECHER und CRONKITE angegeben (3). Sie untersuchten außerdem noch Lösungen mit Magnesiumsulfat, Kaliumoxalat, Natriumoxalat und Natriumchlorid mit Zusatz von Heparin. Jedoch erwies sich die Ammoniumoxalatlösung wegen ihrer guten Hämolyseeigenschaften als günstigste. Über die Hämolysedauer werden keine Angaben gemacht. SIERING empfiehlt aber, 5 Minuten einzu-

halten (11). Die Sedimentationszeit beträgt wie bei der Kokainlösung 15 Minuten. Die Thrombocyten erscheinen als stark lichtbrechende Gebilde, die gut von Bakterien, Hefen und Staub unterschieden werden können. Als Fehler ihrer Methode geben BRECHER und CRONKITE folgende Werte an: Der Fehler, der dadurch verursacht wird, daß die zwei verschiedenen Hälften derselben Zählkammer gezählt werden, beträgt 4,5 %, der Zählkammerfehler 2,1 % und der Pipettenfehler in drei Experimenten 3,2 %, 2,0 % und 4,4 %. Als Gesamtfehler einer Einzelzählung finden sie 11,4 %. Damit weist ihre Thrombocytenzählmethode dieselbe Genauigkeit auf, wie eine Einzelzählung von Leukocyten in der Zählkammer. Um eine Beeinflußung der Thrombocyten durch die Ammoniumoxalatlösung auszuschließen, wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen Zählungen aus einer bei 5° Celsius aufbewahrten Mischung vorgenommen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Thrombocytenzahl. Ebenso kam es bei Zimmertemperatur innerhalb von 8 Stunden zu keinem signifikanten Verlust. Auch konnte keine Veränderung der Zählergebnisse bei Verwendung einer Schüttelvorrichtung festgestellt werden. Der Gebrauch von silikonisierten Pipetten konnte ebenfalls die Ergebnisse nicht verändern.

Als dritte Zählmethode sei noch die von DERLATH erwähnt (4). Er verwendet zur Hämolyse eine 2-prozentige Procainlösung. Als Vorteile dieser Lösung erwähnt er die kurze Hämolysezeit von nur 5 Minuten und die nur 3 Minuten dauernde Sedimentationszeit. Weiterhin kann man in derselben Kammer im gleichen Arbeitsgang noch die Reticulocyten zählen. Diese hätten früher zu Verwechslungen mit gequollenen Thrombocyten Anlaß gegeben.

DERLATH betont noch, daß die Lösungen absolut bakterien- und pilzfrei sein müssen, wenn Verwechslungen vor allem mit Teilchen der Pilzfäden vermieden werden sollen.

Alle diese direkten Zählmethoden sind für die Verwendung von Phasenkontrastmikroskopen entwickelt worden. Jedoch sind sie genauso zur Zählung im einfachen Hellfeldmikroskop geeignet. Dies erwähnte OSTEN bereits 1959, wobei er aber auf eine ausreichende Abdunklung hinwies (8). Auch in neueren Lehrbüchern wird die Verwendung des Hellfeldmikroskops als gleichwertiges Verfahren angegeben (PERLICK, 9; OHLER, 7).

Zur mechanischen Verletzbarkeit der Thrombocyten und der dadurch bedingten Veränderung ihrer Zahl sei noch auf einen Beitrag von BERGHOFF und GLATZEL hingewiesen (2). Sie ließen die gefüllten Pipetten 10 Minuten lang bei 60 Umdrehungen pro Minute rotieren. Dabei fanden sie bei Verwendung von Zitrat und Sequestrennatrium als Verdünnungslösungen für beide eine Abnahme des Zählergebnisses von 20,85 % bzw. 17,8 %.

In verschiedenen neueren Lehrbüchern werden die drei genannten Verdünnungslösungen empfohlen (5, 10, 13). Allerdings schwanken dort die Angaben über die Hämolyse- und Sedimentationsdauer, sowie über die Verwendung von Schüttelvorrichtungen. Für Procain liegen die Angaben über die Hämolysezeit zwischen 5 und 60 Minuten. Bei VINAZZER wird sogar unter Hinweis auf eine nicht so vollständige Hämolyse auf eine Wartezeit verzichtet; stattdessen werden sofort nach Schütteln der Pipetten die Zählkammern beschickt. Die Angaben über die Sedi-

mentationszeit liegen zwischen 10 und 30 Minuten. Ähnlich werden für Ammoniumoxalat Hämolysezeiten zwischen 0 und 60 Minuten und Sedimentationszeiten zwischen 10 und 30 Minuten empfohlen. Bei Kokain liegen die entsprechenden Zeiten zwischen 0 und 20 bzw. 15 und 30 Minuten. Schüttelvorrichtungen werden zum Teil empfohlen, aber auch gänzlich abgelehnt, weil die mechanische Verletzlichkeit der Blutplättchen zu groß ist.

Zusammenfassend kann man also sagen, daß über die Dauer der Hämolyse- und Sedimentationszeit keine Einigkeit bei den verschiedenen Autoren besteht. Dies mag daran liegen, daß die einen besonderen Wert auf eine schnelle Durchführung legen, während den anderen die bessere Erkennbarkeit nach möglichst vollständiger Hämolyse wichtiger ist. Weiterhin erleichtert eine längere Sedimentationszeit die Auszählung, während man bei kürzeren Zeiten mehr an der Mikrometerschraube des Mikroskops drehen muß, um auch die Thrombocyten zu erfassen, die noch nicht vollständig abgesetzt sind. Die Procain- und Ammoniumoxalatlösungen besitzen gegenüber der Kokainlösung den Vorteil, daß sie nicht dem Betäubungsmittelgesetz unterliegen. Außerdem soll die Hämolyse durch die Ammoniumoxalatlösung besonders schnell und vollständig erfolgen (SIERING, 11). Als Untersuchungsmaterial dient bei allen Lösungen Venenblut, das durch ein geeignetes Antikoagulans ungerinnbar gemacht wurde. Man kann wahlweise auch Kapillarblut verwenden. Jedoch sind dann die Fehlermöglichkeiten größer, da an den Wundrändern der Einstichstelle Plättchen haften bleiben können, und außerdem das Blut durch Gewebsflüssigkeit verdünnt werden kann. Die Verdünnung in der Leukopipette beträgt 1 : 20. Es können

auch Erypipetten verwendet werden, die ein Verdünnugsverhältnis von 1 : 100 liefern. Allerdings muß dann in der Zählkammer eine entsprechend grössere Fläche ausgezählt werden, damit der Fehler, der durch die ungleichmäßige Verteilung der Thrombocyten in der Zählkammer bedingt ist, nicht zu groß wird.

Verwendetes Material und Methoden

Die eingangs erwähnten Methoden Thrombofix und Thrombosol versprechen gegenüber den oben angeführten einige Vorteile. Bei Thrombofix sollen durch eine spezielle Kombination von Farbstoffen die Thrombocyten besonders gut als leuchtende Gebilde erkennbar sein. Die Phasenkontrasteinrichtung wird dadurch entbehrlich. Bei Thrombosol handelt es sich um einen Solotest, bei dem das Pipettieren entfällt. Dadurch wird die Gefahr von Kontaminationen vermindert. Die Hämolyse tritt sofort ein, und die Auszählung kann bereits nach 5 Minuten Sedimentationszeit durchgeführt werden. Aus diesem Grund benötigt man auch keine feuchte Kammer. Ausserdem verspricht der Prospekt, daß die Thrombocyten als leuchtende Plättchen mit außergewöhnlicher Klarheit erscheinen.

Im einzelnen wurde bei der Vergleichsuntersuchung folgendermaßen vorgegangen:

Als Material diente Venenblut, das in EDTA-beschichteten Plastikröhrchen ungerinnbar gemacht wurde. Das Blut stammte von Patienten der Poliklinik München, bei denen im hämatologischen Labor verschiedene Untersuchungen vorgenommen wurden. Für diesen Vergleich wurden davon ohne irgendwelche besonderen Auslesekriterien Proben entnommen. Es handelte sich also nicht wie bei anderen Untersuchungen um gesunde Normalpersonen, sondern um Patienten mit den verschiedensten Krankheiten, die normale und pathologische Thrombocytenzahlen aufwiesen. Dies sei besonders unterstrichen, damit nicht etwa die hieraus resultierenden Mittelwerte mit denen anderer Untersuchungen verglichen werden.

Als Zählkammer wurde die improved NEUBAUER-Kammer verwendet. Sie unterscheidet sich von der herkömmlichen NEUBAUER-Kammer dadurch, daß das zentrale Feld von 1 mm^2 Fläche nicht in 16 Gruppenquadrate unterteilt ist, sondern in 25. Bei der Vorbereitung der Kammer ist darauf zu achten, daß Kammer und Deckglas absolut fettfrei sind, und daß auf der gesamten Auflagefläche des Deckglases auf der Kammer Newton'sche Ringe sichtbar werden.

Ausgezählt wurden die Proben mit einem Hellfeldmikroskop unter Verwendung des Objektivs Leitz 45 : 1, A: 0,65 und eines Okulars 6-fach. Die Gesamtvergrößerung betrug also 270 mal. Bei dieser Vergrößerung erschien im Blickfeld gerade ein Gruppenquadrat von 1/5 mm Seitenlänge. Auf einen waagrechten Stand des Mikroskops wurde geachtet.

Bei der Zählung wurden von den Thrombocyten, die auf den Begrenzungslinien der Gruppenquadrate lagen, jeweils nur diejenigen der oberen und linken Begrenzung berücksichtigt; dadurch wurden zu hohe Ergebnisse vermieden.

Von jeder Blutprobe wurden mit den drei Verdünnungslösungen jeweils Doppelwerte bestimmt, so daß insgesamt mit jedem Blut sechs Zählungen durchgeführt wurden. Dies entspricht der allgemein üblichen Zählvorschrift, nach der Doppelzählungen gemacht werden sollen, und deren Mittelwert als Befund mitgeteilt werden soll, sofern die Einzelwerte um höchstens 15 % voneinander abweichen.

Aus dem Vorratsgefäß mit der 2-prozentigen Procainlösung wurde etwas in ein Reagenzglas gefüllt, da sonst die Möglichkeit einer Verunreinigung der

Vorratslösung durch das ständige Aufziehen bestanden hätte. Mit zwei Leukopipetten wurde jeweils bis zur Marke 0,5 Blut aufgezogen. Es wurde besonderer Wert darauf gelegt, daß dies luftblasenfrei geschah. Anschließend wurden die Pipettenspitzen vorsichtig mit einem Tupfer abgewischt, dann wurde sofort Procainlösung bis zur Marke 11 nachgezogen. Unter Dreh- und Kippbewegungen wurden Blut und Procainlösung vorsichtig vermischt. Die so vorbereiteten Pipetten wurden anschließend 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur liegengelassen. Nach Ablauf dieser Hämolysezeit wurde der Pipetteninhalt nochmals durch leichtes Schütteln vermischt. Daraufhin wurden die ersten fünf bis sechs Tropfen verworfen, da diese noch verhältnismäßig zuviel Procainlösung enthalten. Die beiden Hälften einer improved NEUBAUER-Kammer wurden dann aus den beiden Pipetten beschickt, sodaß in derselben Kammer also beide Zählungen mit der Procainlösung durchgeführt werden konnten. Um eine genügende Sedimentation zu erreichen, wurde die so vorbereitete Zählkammer noch 15 Minuten in einer feuchten Kammer aufbewahrt, bevor mit den Zählungen begonnen wurde. Gezählt wurde die Fläche von 5 Gruppenquadraten, also insgesamt 1/5 mm^2. Bei jeder Zählung wurden immer wieder die gleichen 5 Quadrate ausgezählt. Da sich bei der Verwendung von Leukopipetten ein Verdünnungsverhältnis von 1 : 20 ergibt und die Höhe der NEUBAUER-Kammer 1/10 mm beträgt, gibt das mit 1000 multiplizierte Ergebnis die Thrombocytenzahl pro mm^3 Blut an. Bei niedrigen Thrombocytenzahlen wurden im Bereich von 50 000 bis 100 000 Thrombocyten/mm^3 10 Gruppenquadrate und im Bereich unter 50 000 entsprechend 15 Quadrate ausgezählt. Der Multiplikationsfaktor verringert sich dann auf 500 bzw. 333.

Mit Thrombofix wurde in derselben Weise verfahren. Lediglich die Hämolysezeit wurde laut Verarbeitungsvorschrift mit 5 Minuten kürzer gehalten. Auch hier wurden die Doppelbestimmungen in den beiden Hälften derselben Zählkammer durchgeführt.

Das Vorgehen mit Thrombosol dagegen ist ganz anders. Hier waren keine Mischpipetten notwendig, da es sich bei dieser Methode um einen Solotest handelt, bei dem schon jeweils 2 ml Thrombosol in ein Polypropylenröhrchen abgefüllt sind. Zu diesen 2 ml Verdünnungslösung werden mit Hilfe einer Kapillarpipette 20 ul Blut gegeben. Anschließend wird das Röhrchen wieder verschlossen und der Inhalt durch vorsichtiges Schütteln vermischt. Die Hämolyse erfolgt hier sofort. Es kann also unmittelbar im Anschluß ans Mischen die Zählkammer gefüllt werden. Dazu ist am Stopfen ein Probeträger angebracht. Nach circa 5 Minuten sind die Thrombocyten sedimentiert, und es kann mit der Zählung begonnen werden. Da die Verdünnung hier 1 : 100 beträgt, wurden nicht wie bei Procain und Thrombofix 5 Gruppenquadrate ausgezählt, sondern eine Fläche von 1 mm^2. So wurde erreicht, daß der Multiplikationsfaktor auch hier 1000 beträgt und daß also bei jedem Patienten mit jeder der drei Methoden etwa eine gleich große Zahl von Thrombocyten gezählt wurde.

Auf diese Weise wurde Blut von 170 verschiedenen Patienten gezählt, also insgesamt 1020 Einzelzählungen. Außerdem wurden in zwei Fällen von Thrombopenie Mehrfachbestimmungen an verschiedenen Tagen durchgeführt, und zwar in einem Fall 15 Zählungen, im anderen 7. Damit sollte untersucht werden, ob die drei Lösungen im unteren pathologi-

schen Bereich unterschiedliche Ergebnisse liefern.

Um sicherzustellen, daß die genannten Sedimentationszeiten ausreichend sind, wurde noch folgende Untersuchung durchgeführt: Von jeweils 10 verschiedenen Blutproben wurden mit den drei Verdünnungslösungen Mischungen hergestellt und Zählkammern beschickt. Diese Zählkammern wurden bei Verwendung von Procain und Thrombofix nach 15, 30 und 45 Minuten ausgezählt, bei Thrombosol entsprechend nach 5, 10 und 15 Minuten. In der Zeit zwischen den drei Zählungen wurden die Kammern in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Schließlich wurde noch untersucht, ob vielleicht bei Verwendung von einer Phasenkontrasteinrichtung andere Ergebnisse erzielt werden als mit dem Hellfeldmikroskop. Dazu wurde das Phasenkontrastobjektiv Leitz PV 25/0,50 n und ein 10-fach vergrößerndes Okular verwendet. Die Vergrößerung betrug also 250 mal. Es wurden 30 Testansätze mit Procainlösung jeweils im Hellfeld und anschließend mit der Phasenkontrasteinrichtung gezählt oder umgekehrt.

Ergebnisse

Vergleich Hellfeld - Phasenkontrast

Mit beiden Verfahren waren die Thrombocyten einwandfrei zu identifizieren. Im Hellfeld erschienen sie als kleine schwarze Punkte, die bei vorsichtigem Drehen an der Mikrometerschraube hell aufleuchteten. Ähnlich war ihr Verhalten im Phasenkontrastmikroskop. Hier erwiesen sich jedoch die Schatten der Erythrocyten als störender, da sie als dunkle Scheiben wesentlich deutlicher erkennbar waren als im Hellfeldmikroskop. Dort erschienen sie neben den hell aufleuchtenden Thrombocyten nur als schwächer leuchtende Ringschatten. Im Hellfeld hoben sich die Thrombocyten also deutlicher von ihrer Umgebung ab, als im Phasenkontrastbild. Die Ergebnisse der 30 Zählungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zur statistischen Auswertung wurde der t-Test für paarige Stichproben gerechnet. Er ergab einen t-Wert von 0,1239. Die obere Signifikanzschranke beträgt nach der Tabelle 3,659 für 2P = 0,001 (12). Daraus folgt, daß sich die Werte, die man bei der Zählung mit dem Phasenkontrastmikroskop erhält, nicht signifikant von denen unterscheiden, die im Hellfeld gezählt werden. Daß sich diese Werte geringfügig unterscheiden und nicht identisch sind, mag daran liegen, daß beim Auszählen jedesmal kleine Fehler gemacht werden. Wahrscheinlich wird wohl niemand beim mehrfachen Auszählen derselben fünf Gruppenquadrate immer exakt gleiche Ergebnisse erhalten. Es könnte aber auch sein, daß einzelne Thrombocyten, die bei der ersten Zählung noch auf einer Begrenzungslinie eines Quadrates lagen, zum Beispiel auf Grund von Erschütterungen ihren Platz nur geringfügig verän-

dert haben, so daß sie bei der folgenden Zählung nicht mehr gezählt wurden bzw. jetzt erst berücksichtigt werden konnten.

An dieser Stelle sei auf eine Arbeit von WEISBERG verwiesen, der im Rahmen einer Fehleranalyse der Thrombocytenzählung folgendes zu diesem Punkt fand (14): Er ließ dieselben Gruppenquadrate einer Zählkammer 20 mal von der gleichen Person auszählen. Die Differenz zwischen dem größten und dem kleinsten gefundenen wert betrug dabei 9,64 % bezogen auf den höchsten Wert.

Sedimentationsversuch

Die Ergebnisse im Sedimentationsversuch sind in Tabelle 2 jeweils getrennt für die drei Verdünnungslösungen aufgeführt. Zur statistischen Beurteilung wurde für jede Lösung die einfache Varianzanalyse gerechnet. Sie ergab für Procain einen F-Wert von 0,00456, für Thrombofix betrug er 0,1133 und für Thrombosol 0,0074. Der Tabellenwert für die obere Signifikanzschranke beträgt für alle drei Fälle 5,49 für P = 0,01 (12). Auf Grund dieses Ergebnisses kann man die Aussage treffen, daß zwischen den Zählergebnissen zu den jeweils drei verschiedenen Zeiten kein signifikanter Unterschied besteht. Für Thrombofix und Procain sind also die angegebenen 15 Minuten Sedimentationszeit ausreichend, während man bei Thrombosol mit nur 5 Minuten auskommt. Hier sei noch einmal darauf hingewiesen, daß man auch bei kürzeren Sedimentationszeiten noch alle Thrombocyten erfassen kann, wenn man durch Betätigung der Feineinstellung des Mikroskops die gesamte Höhe der Zählkammer absucht. Jedoch ist die Einhaltung von 15 bzw. 5 Minuten sehr zu empfehlen, da dadurch der Zählvorgang wesentlich erleichtert wird. Die Abweichungen, die zwischen den jeweils drei Werten aufgetreten sind, lassen sich ähnlich wie beim oben beschriebenen Vergleich erklären. Einmal dürften sie durch Zählfehler bedingt sein und zum anderen durch Verschiebungen von Thrombocyten, die am Rand der Zählquadrate lagen. Diese Platzveränderungen dürften dadurch zustande kommen, daß die Zählkammern bewegt und erschüttert werden, immer wenn sie zwischen den Zählungen vom Mikroskoptisch in die feuchte Kammer zurückgelegt und anschließend wieder herausgenommen werden.

Vergleichsuntersuchung

Zunächst sollen die mikroskopischen Bilder beschrieben werden, wie sie sich bei den drei verschiedenen Lösungen ergaben. Bei allen erschienen die Thrombocyten als kleine schwarze Punkte, die bei leichtem Drehen an der Mikrometerschraube hell aufleuchteten. Die letztere Einstellung erwies sich für die Zählung als am günstigsten. Bestand einmal Unklarheit darüber, ob es sich um einen Thrombocyten oder um eine Verunreinigung handelte, so konnte fast immer eine Entscheidung dadurch getroffen werden, daß die Feineinstellung verändert wurde. Dabei wurde das fragliche Gebilde bei der Einstellung gemustert, bei der es schwarz erschien. Anschließend wurde beim Drehen der Mikrometerschraube sein Aufblinken und sein Aussehen im leuchtenden Zustand beobachtet. Thrombocyten zeigten bei dieser Prozedur immer ein ganz charakteristisches Verhalten. So konnten sie meistens von Verunreinigungen abgegrenzt werden. Sicher kann es manchmal vorkommen, daß ein Staubteilchen oder eine sonstige Verunreinigung fälschlicherweise mitgezählt wird. Es ist aber anzunehmen, daß dieser Fehler nicht allzu groß ist und außerdem für alle Zählungen wahrscheinlich als gleich hoch anzusetzen ist. Die Erythrocytenmembranen waren bei Thrombosol am wenigsten störend. Das liegt aber freilich an der fünfmal stärkeren Verdünnung gegenüber den beiden anderen Verfahren. Sie waren nämlich auch hier als ringförmige Gebilde deutlich zu erkennen, nur lagen sie eben weiter über das Blickfeld verstreut. Bei Procain und Thrombofix lagen sie entsprechend dichter, wobei sie in der Procainlösung deutlicher waren als in Thrombofix. Dazu muß man aber sagen, daß sie trotzdem die Erkennbarkeit und

damit die Zählung der Thrombocyten nicht erschwerten. Diese beiden Verdünnungslösungen boten im mikroskopischen Bild keine wesentlichen Unterschiede. Im Gegensatz zu den Schatten der Erythrocyten erwiesen sich die Leukocyten bei einem Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie als besonders störend. Sie nahmen hier den größten Teil des Blickfeldes ein. Es kam auch zu Anlagerungen der Blutplättchen an die Leukocyten, so daß die Identifizierung der Thrombocyten oftmals sehr schwierig war bzw. gar nicht erfolgen konnte. Das Blut dieses Patienten, der übrigens eine Thrombopenie zeigte, wurde insgesamt siebenmal gezählt. Dabei ergab sich, daß die Ergebnisse mit Thrombofix in sechs Fällen deutlich unter denen von Procain und Thrombosol lagen. Scheinbar wurde in diesem Fall die Anlagerung der Blutplättchen an die Lymphocyten durch die Thrombofix-Lösung stärker begünstigt, als es bei Procain und Thrombosol der Fall war. Jedoch sei dabei ausdrücklich unterstrichen, daß bei diesem Patienten die Zählung wahrscheinlich sowieso zu niedrige Ergebnisse erbrachte,da bei der großen Zahl von Lymphocyten sicherlich nicht alle Thrombocyten erkannt werden konnten.

Die Thrombocyten stellten sich nicht bei jedem Patienten mit der gleichen Deutlichkeit dar. Bei manchen waren sie schlechter zu erkennen, weil sie nicht so hell aufleuchteten wie bei der Mehrzahl der Patienten. Man konnte sie dann bei der Mikroskopeinstellung, bei der sie als schwarze Punkte erschienen, besser zählen. Diese schlechtere Erkennbarkeit war dann bei allen drei Lösungen festzustellen. Besonders negativ wirkte sich jedoch dieses Verhalten der Blutplättchen bei Thrombofix aus. Hier wurde die Zählung zum

Teil erheblich erschwert. Ursache für dieses Verhalten könnte vielleicht eine verminderte Resistenz der Thrombocyten gegenüber der Verdünnungslösungen sein, die bei verschiedenen Krankheiten oder bei Gabe bestimmter Medikamente auftritt. Dies muß jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

Generell kann man über die drei Lösungen folgendes sagen: Am besten und deutlichsten waren die Thrombocyten in der Thrombosol-Lösung zu erkennen, was aber sicher an der höheren Verdünnung liegt. Die Erkennbarkeit in Procain und Thrombofix dürfte man als etwa gleich gut bewerten, vielleicht kann man sogar sagen, daß die Procainlösung etwas besser abschneidet, vor allem wegen ihres besseren Verhaltens gegenüber den eben erwähnten schlechter erkennbaren Thrombocyten. Auch waren bei Thrombofix die Thrombocyten desselben Patienten unterschiedlich deutlich (s. auch Fotos!), was für die beiden anderen Lösungen in geringerem Ausmaß zutraf. Größere Verklumpungen der Blutplättchen konnten in keiner der drei Lösungen gefunden werden.

Die Zählergebnisse der 170 Vergleichszählungen sind in Tabelle 3 aufgeführt. Zu ihrer statistischen Auswertung wurde am Münchner Institut für Statistik und Biomathematik eine Varianzanalyse nach dem Programm BMDP2V gerechnet. Der Computerausdruck ist am Ende der Arbeit zu finden. Er zeigte folgende Ergebnisse:

Zwischen den Werten der drei Methoden besteht kein signifikanter Unterschied. Der errechnete F-Wert beträgt 29,12273. Die Wahrscheinlichkeit, daß F überschritten wurde, liegt für diesen Wert bei 0,0.

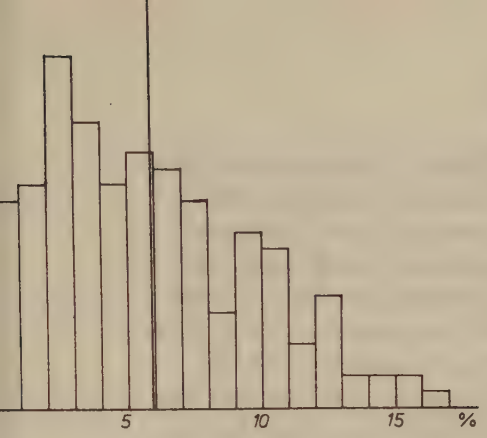
Zwischen den Werten der Doppelzählungen bei den drei Methoden besteht ein signifikanter Unterschied. Der entsprechende F-Wert beträgt hier 0,22523. Damit ist die Wahrscheinlichkeit dafür, daß F überschritten wurde, hier 0,636.

Um zu überprüfen, ob dieser signifikante Unterschied zwischen den Doppelwerten auf eine besonders große Streuung einer einzelnen Verdünnungslösung zurückgeführt werden kann, wurden die prozentualen Abweichungen zwischen den Ergebnissen der Doppelzählungen für jede Methode berechnet. Dabei ergab sich für Procain eine mittlere Abweichung von 5,86 %, für Thrombofix von 5,46 % und für Thrombosol von 6,11 %. Dabei streuten die Unterschiede der Einzelwerte für alle drei Lösungen zwischen 0 % und 17 %. Zur graphischen Veranschaulichung dieser Befunde dient die Abbildung 1. Dort ist auf der Abszisse jeweils die Abweichung zwischen den Doppelwerten in Prozent aufgetragen, auf der Ordinate die zugehörige Fallzahl. Dabei wurde die Prozentskala in 1-Prozentintervalle unterteilt, so daß zum Beispiel alle die Fälle, bei denen die Abweichung zwischen 1 % und 2 % lag, innerhalb einer Säule zusammengefaßt wurden. Man kann also auf Grund dieser Ergebnisse ausschließen, daß der signifikante Unterschied zwischen den Einzelwerten der Doppelbestimmungen auf die besonders große Streuung einer einzelnen Methode zurückzuführen ist. Vielmehr weisen alle drei Lösungen eine etwa gleich große durchschnittliche Streuung auf. Diese Streuung, die zwischen 5 % und 6 % liegt, entspricht damit etwa dem Zählnetz- und Pipettenfehler, den BRECHER und CRONKITE für ihre Ammoniumoxalatlösung fanden. Tatsächlich liegt ja der methodische Unterschied zwischen den Einzelwerten

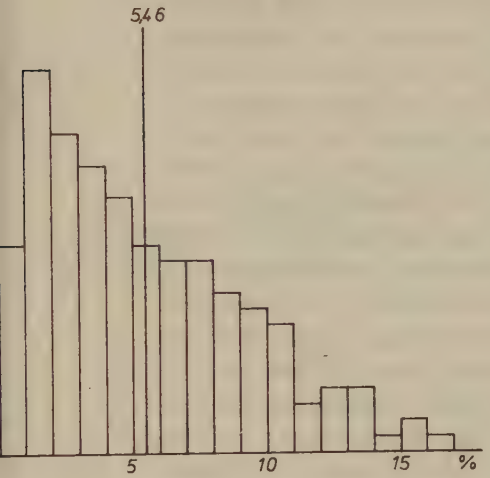
darin, daß zwei verschiedene Pipetten - bzw. Plastikröhrchen bei Thrombosol - und die beiden verschiedenen Hälften derselben Zählkammer für die jeweiligen Doppelzählungen verwendet wurden. Weiterhin läßt sich aus diesen Befunden entnehmen, daß durch das Wegfallen des Pipettierens bei Thrombosol keineswegs die Streuung geringer gehalten werden konnte, zeigte sie doch mit durchschnittlich 6,11 % den höchsten Wert bei den drei Lösungen. Der signifikante Unterschied zwischen den Doppelwerten läßt sich also als Ungenauigkeit der Zählkammermethode überhaupt interpretieren.

Abbildung 1:

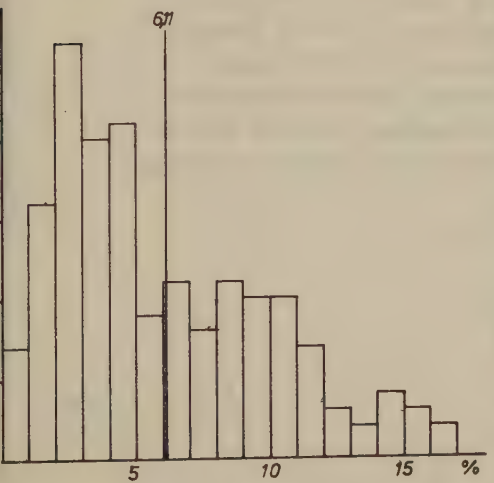
prozentuale Abweichung zwischen den Doppelbestimmungen



a, bei Procain



b, bei Thrombofix



c, bei Thrombosol

Weiterhin wurden die durchschnittlichen prozentualen Abweichungen zwischen den Mittelwerten der Doppelbestimmungen mit Thrombofix bzw. Thrombosol und den zugehörigen Procainwerten errechnet. Das ergab zwischen Procain und Thrombofix eine durchschnittliche Abweichung der Mittelwerte von 6,58 %, zwischen Procain und Thrombosol eine solche von 7,55 %. Diese Werte liegen etwas höher als die der Streuungen zwischen den Doppelwerten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß sich hier zu dem Zählnetz- und Pipettenfehler zusätzlich noch ein Zählkammerfehler addiert, da ja bei den Zählungen mit mehreren Zählkammern gearbeitet wurde. Eine genauere Analyse ergab weiterhin, daß die Mittelwerte mit Thrombofix durchschnittlich um 1,56 % unter denen von Procain lagen. Die von Thrombosol überschritten die Procainmittelwerte um durchschnittlich 4,14 %. Dabei schwankten die Unterschiede zwischen +/- 35 %. Um auch diesen Sachverhalt zu veranschaulichen, wurde Abbildung 2 angefertigt. Dort sind auf der Abszisse die prozentualen Abweichungen der Thrombofix- bzw. Thrombosolmittelwerte von den zugehörigen Procainmittelwerten aufgetragen. Auf der Ordinate finden sich die entsprechenden Häufigkeiten. Die Prozentskala wurde wieder in 1-Prozentintervalle aufgeteilt. Man erkennt, daß die Mehrzahl der Abweichungen etwa zwischen +/- 20 % liegen. Weiterhin läßt sich der leichte Trend von Thrombofix zu niedrigeren Werten erkennen, daneben der etwas größere Trend von Thrombosol zu höheren Werten.

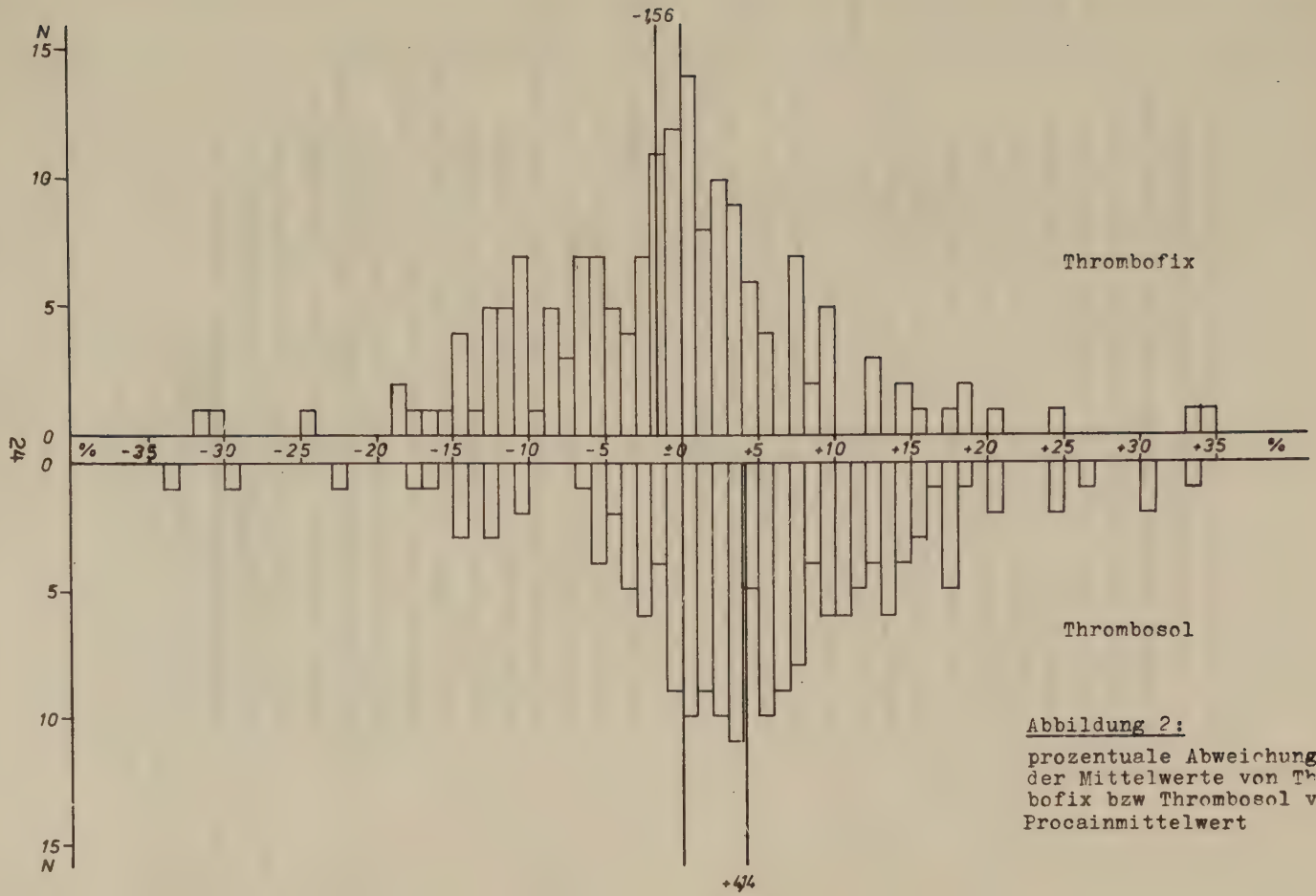


Abbildung 2:

prozentuale Abweichung der Mittelwerte von Thrombofix bzw Thrombosol vom Procainmittelwert

In den Abbildungen 3 und 4 wurden die Thrombofix- bzw. Thrombosolmittelwerte gegen die zugehörigen Procainmittelwerte aufgetragen. In jede Abbildung wurde die entsprechende Regressionsgerade eingezeichnet. Ihre Gleichung lautet für Procain und Thrombofix $y = 0{,}95583\ x + 4{,}744$ und für Procain und Thrombosol $y = 1{,}10266\ x - 10{,}167$. In den beiden Regressionskoeffizienten von 0,95583 und 1,10266 lassen sich wieder die oben erwähnten Trends von Thrombofix und Thrombosol erkennen. Die zusätzlich noch errechneten Korrelationskoeffizienten betragen für Procain und Thrombofix 0,972217, für Procain und Thrombosol 0,959273. Man erkennt, daß Thrombosol etwas schlechter mit Procain korreliert, was auch nicht verwundert, da Thrombosol um durchschnittlich 4,14 % höhere Werte liefert als Procain, Thrombofix dagegen nur um durchschnittlich 1,56 % unter Procain liegt. Dieser Trend von Thrombosol zu höheren Werten ließe sich folgendermaßen erklären: Bei Procain und Thrombofix gehen vielleicht einige Thrombocyten dadurch verloren, daß mit Leukopipetten gearbeitet werden muß. Dabei können Thrombocyten an den Glaswänden der Pipetten haften bleiben; so können sich dann zu niedrige Werte ergeben. Bei Thrombosol scheidet diese Fehlermöglichkeit aus. Es ist aber anzunehmen, daß dieser Fehler bei Thrombofix und Procain für alle Zählungen gleich groß ist, und daß deshalb diese Zählmethoden keineswegs als unsicherer zu bewerten sind als die Thrombosolmethode. Dies mag auch daran deutlich werden, daß ja die Abweichung zwischen den Thrombosoldoppelwerten keineswegs geringer ist, als es bei Procain und Thrombofix der Fall ist.

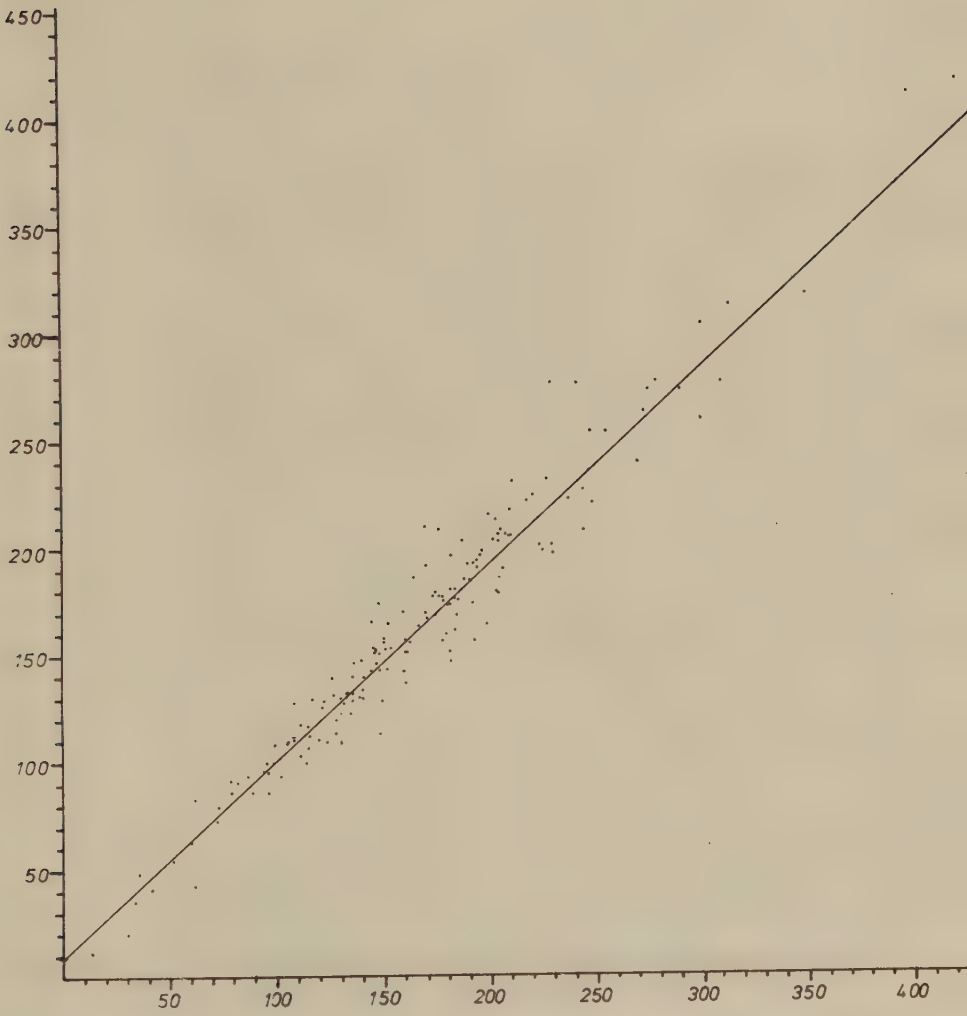


Abbildung 3: Abszisse: Mittelwerte der Doppelbestimmungen mit Procain

Ordinate: Mittelwerte der Doppelbestimmungen mit Thrombofix

Die Zahlen bedeuten: x1000 Thrombocyten/mm^3

Regressionsgerade: y=0,95583x+4,744

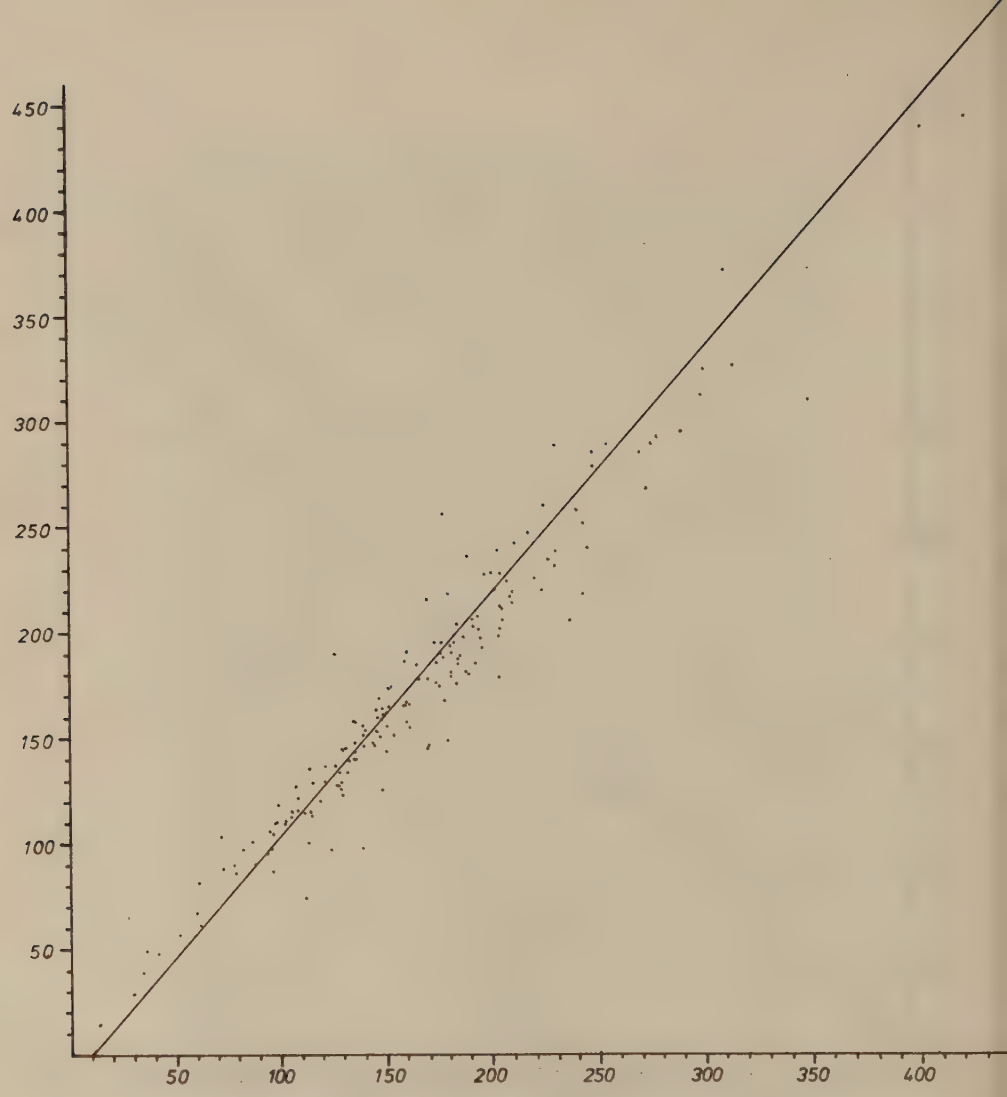


Abbildung 4: Abszisse:Mittelwerte der Doppelbestimmungen mit Procain

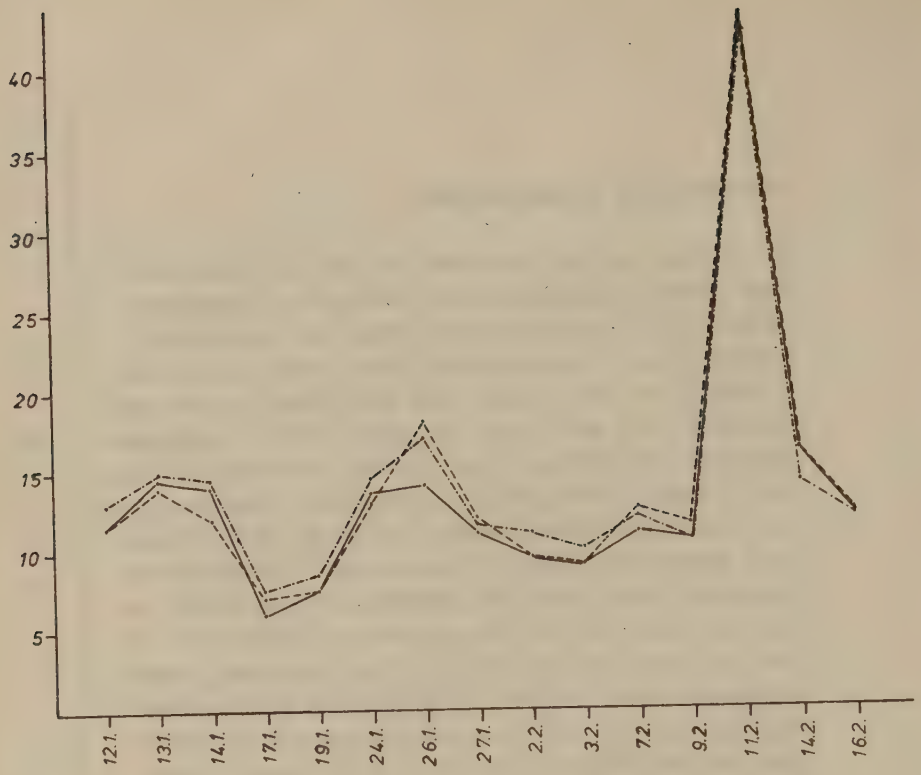
Ordinate:Mittelwerte der Doppelbestimmungen Thrombosol

Die Zahlen bedeuten: x1000 Thrombocyten/mm^3

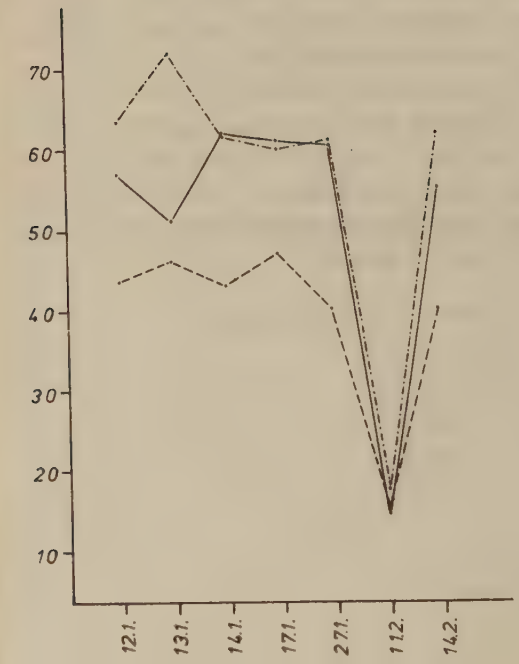
Regressionsgerade: y=1,10266x-10,167

Verhalten bei Thrombopenien

Die Werte, die bei den zwei Fällen von Thrombopenien gezählt wurden, zeigt Tabelle 4. Zusätzlich wurden die Mittelwerte der jeweiligen Doppelzählungen an den verschiedenen Tagen noch in der Abbildung 5 aufgezeichnet. Aus Abbildung 5a kann man erkennen, daß alle drei Lösungen nahezu identische Ergebnisse brachten. Beim zweiten Patienten lassen sich jedoch Unterschiede feststellen (Abbildung 5b). Bei diesem Patienten handelt es sich um den schon oben erwähnten Fall mit chronischer lymphatischer Leukämie. Hier lagen die Thrombofixwerte unter denen von Procain, die Ergebnisse mit Thrombosol waren meistens etwas höher. Auf die niedrigen Thrombofixwerte und ihre mögliche Ursache wurde schon eingegangen. Die höheren Ergebnisse mit Thrombosol dagegen sind sicherlich mit der größeren Verdünnung von 1 : 100 zu erklären. Dadurch standen im mikroskopischen Bild die Lymphocyten nicht so eng aneinander wie bei der Verwendung von Procain und Thrombofix mit einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 20. Deshalb konnten auch die Thrombocyten besser erkannt werden. In diesem Fall brachte also die Verwendung von Thrombosol zur Zählung bessere Ergebnisse als die beiden anderen Lösungen. Selbstverständlich mußte aber mit Thrombosol eine fünf mal größere Fläche ausgezählt werden.



5a, Patient 1



5b, Patient 2

Abbildung 5:

Thrombopenien
Zahlen: x1000 Thrombocyten/mm^3

——— Trocain

------ Thrombolix

-·-·-·- Thrombosol

Zusammenfassung

Es werden zwei neue Verdünnungslösungen zur direkten mikroskopischen Thrombocytenzählung gegen die 2-prozentige Procainlösung nach DERLATH getestet. Von den beiden neuen Lösungen ist das Vorgehen mit Thrombofix identisch zu dem mit Procain, während Thrombosol als Solotest mit fertig vorbereiteten Plastikröhrchen arbeitet. Dadurch entfällt das Pipettieren mit der Leukopipette und die damit verbundene Möglichkeit zu Kontaminationen. Der Zeitaufwand für eine Zählung beträgt bei der Zählung mit Procain in der Weise, wie sie hier durchgeführt wurde, etwa 50 Minuten, bei Thrombofix etwa 25 Minuten und bei Thrombosol etwa 10 Minuten. Die kürzeren Zeiten der beiden neuen Methoden ergeben sich bei Thrombofix durch eine auf 5 Minuten verkürzte Hämolysezeit gegenüber Procain, und bei Thrombosol durch den Wegfall dieser Zeit und die nur 5 Minuten in Anspruch nehmende Sedimentationszeit. Dazu ist anzufügen, daß auch für Procain eine Hämolysezeit von nur 5 Minuten in der Originalarbeit DERLATH's angegeben ist (4), so daß eigentlich nur Thrombosol in Hinblick auf den Zeitaufwand eine Verbesserung darstellt. Auch hinsichtlich des mikroskopischen Bildes ist Thrombosol am besten zu bewerten. Thrombofix bringt hier gegenüber Procain keine Vorteile. Die besonders gute Erkennbarkeit der Thrombocyten in der Thrombosollösung ist aber sicherlich zum Großteil auf die höhere Verdünnung zurückzuführen, mit der Thrombosol arbeitet. Zwischen den Zählergebnissen der drei Methoden konnte insgesamt kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Allerdings lieferte Thrombofix um durchschnittlich 1,56 % niedrigere Werte als Procain, Thrombosol um durch-

schnittlich 4,14 % höhere. Dieses Verhalten von Thrombosol ist wahrscheinlich auf die schonendere Behandlung der Thrombocyten durch das Wegfallen der Leukopipetten aus dem Zählvorgang zurückzuführen. Die Abweichungen zwischen den Doppelbestimmungen lagen bei allen drei Methoden etwa gleich hoch. Die höhere Verdünnung von Thrombosol erwies sich in einem Fall mit chronischer lymphatischer Leukämie als günstig.

Für alle drei Lösungen hat sich die Verwendung eines einfachen Hellfeldmikroskopes zur Auszählung gut bewährt. Eine Phasenkontrasteinrichtung ist deshalb nicht unbedingt erforderlich.

Man kann also sagen, daß Thrombofix die Thrombocytenzählung im Vergleich zur Procainlösung nicht vereinfachen und verbessern konnte. Thrombosol stellt dagegen wegen der besseren Erkennbarkeit der Thrombocyten und wegen des geringeren Zeitaufwandes eine bessere und in der Handhabung einfachere Methode dar. Allerdings müssen dabei auch die wesentlich höheren Kosten , die bei der Verwendung von Thrombosol anfallen, mit in Kauf genommen werden.

Tabellen

alle Zahlen bedeuten: x 1000 Thrombocyten/mm^3

Tabelle 1

Vergleich Hellfeld - Phasenkontrast

Hellfeld	Phasenkontrast
142	137
337	339
485	492
158	162
120	119
135	136
146	146
129	131
207	207
119	121
165	162
184	187
136	140
97	97
135	131
190	188
271	275
201	200
126	125
144	146
140	136
144	142
289	284
351	352
166	168

Fortsetzung Tabelle 1

Hellfeld	Phasenkontrast
135	133
140	137
190	188
147	148
283	281

Tabelle 2

Sedimentationsversuch

Procain nach	15	30	45	Minuten
	225	226	222	
	186	194	196	
	179	190	183	
	164	163	171	
	142	145	140	
	199	186	204	
	184	190	190	
	148	150	148	
	239	235	236	
	299	300	294	

Thrombofix nach	15	30	45	Minuten
	182	184	187	
	160	172	170	
	195	192	189	
	168	160	164	
	184	180	185	
	163	164	164	
	244	236	239	
	173	170	171	
	257	260	258	
	319	320	320	

Fortsetzung Tabelle 2

Thrombosol nach	5	10	15	Minuten
	280	273	275	
	342	345	348	
	250	248	255	
	184	178	180	
	263	268	265	
	342	352	350	
	184	187	185	
	275	273	270	
	288	280	287	
	265	267	265	

Tabelle 3

Vergleichszählung

Procain		Thrombofix		Thrombosol	
192	194	151	165	210	200
183	181	153	151	195	190
151	145	152	151	140	160
125	104	117	118	140	130
205	175	176	210	245	230
130	148	140	121	100	95
141	157	112	114	135	115
32	28	19	22	31	27
244	246	208	210	240	260
115	113	99	100	100	100
160	139	120	138	150	170
184	186	153	171	235	170
258	254	253	257	275	300
154	169	140	135	180	200
218	196	205	178	195	215
138	154	155	153	175	151
105	102	97	99	120	101
172	185	162	152	235	275
230	246	237	210	237	172
360	340	327	312	315	300
210	226	219	227	232	260
200	209	184	174	185	210
225	254	231	226	224	213
120	124	135	117	123	135
297	304	251	271	295	325
196	175	158	180	175	194
190	161	183	175	179	191
193	202	202	196	204	180
90	76	85	101	105	90

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Procain		Thrombofix		Thrombosol	
126	134	114	106	135	115
127	145	136	130	162	152
100	92	83	87	99	96
217	235	193	205	256	262
167	175	160	176	137	155
70	76	85	75	87	89
124	136	117	129	130	116
139	125	127	129	150	140
165	175	208	214	211	219
191	173	149	146	188	172
175	185	152	169	145	151
413	391	393	435	410	455
132	128	134	128	131	127
233	227	271	285	273	301
287	271	292	266	300	280
136	155	163	169	155	137
264	284	276	254	281	251
275	277	274	277	268	306
150	148	178	172	150	177
144	160	150	138	159	169
102	104	92	96	111	107
125	131	112	116	120	134
156	148	146	142	186	160
121	110	115	111	119	107
201	207	172	188	163	193
191	208	166	164	224	228
228	234	190	206	238	237
83	76	96	88	82	90
223	212	223	241	235	247
118	112	131	129	130	126
247	251	234	210	266	288

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Procain		Thrombofix		Thrombosol	
60	64	83	84	85	77
195	215	178	196	234	220
77	67	69	77	108	98
158	164	152	164	155	159
223	199	206	206	222	204
179	175	201	217	175	173
58	66	44	42	61	62
13	15	13	11	15	14
53	51	58	52	56	57
128	129	123	117	131	135
174	180	177	179	198	190
43	41	42	41	46	50
159	167	148	156	168	165
183	187	175	179	185	189
107	213	203	209	213	219
58	62	67	59	66	67
183	190	184	169	186	190
225	219	227	224	227	221
147	155	155	161	145	141
149	154	159	155	148	162
154	155	150	158	149	153
123	117	113	109	124	116
145	153	139	148	154	162
33	35	35	36	40	38
101	112	108	113	118	111
202	189	198	186	208	194
250	244	238	234	235	242
92	102	82	91	90	83
135	145	135	126	153	149
271	269	278	304	298	268
183	181	166	182	189	169

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Procain		Thrombofix		Thrombosol	
36	36	53	45	50	48
112	105	121	136	122	121
110	114	106	101	72	76
122	133	132	148	128	145
127	122	114	107	98	95
141	126	135	131	130	136
183	171	177	179	193	185
177	192	178	184	173	177
181	195	176	196	179	182
167	153	173	170	187	184
208	204	198	220	198	212
202	185	182	206	185	183
145	138	137	143	149	157
185	177	181	188	212	223
108	115	110	126	113	115
138	152	139	147	143	151
159	171	190	194	180	174
221	197	208	206	209	237
238	222	209	195	221	239
240	216	225	241	229	237
185	191	200	208	202	192
138	142	146	150	152	158
115	131	125	133	130	142
151	179	150	136	166	163
172	178	161	178	178	173
165	160	154	150	159	172
92	108	110	108	121	115
92	86	87	86	88	92
95	94	100	93	96	94
99	95	95	97	101	107
151	144	154	152	159	177

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Procain		Thrombofix		Thrombosol	
82	76	90	83	89	90
131	142	146	148	137	142
147	129	129	130	159	155
152	151	160	147	158	164
148	134	134	135	146	143
129	126	129	135	130	124
137	129	134	128	137	140
135	137	146	135	142	136
102	90	99	102	99	111
166	174	170	170	147	142
177	158	160	169	178	175
122	108	108	107	117	112
160	165	154	159	157	152
174	184	168	184	166	168
110	102	108	112	115	110
193	188	183	188	184	175
188	179	193	201	203	185
170	178	187	169	199	189
236	261	248	262	282	284
188	198	173	177	195	209
128	132	135	126	142	146
324	298	282	275	377	359
218	232	195	209	210	227
144	150	158	146	150	154
306	296	313	298	326	318
105	111	110	112	129	125
181	184	176	186	191	188
425	421	428	412	434	444
112	104	113	109	114	116
131	139	118	128	145	140
211	197	219	209	233	242

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Procain		Thrombofix		Thrombosol	
205	205	208	206	221	201
205	201	198	210	223	215
205	197	218	215	239	214
133	139	128	138	143	151
87	88	98	90	101	100
213	197	205	202	191	211
97	101	99	101	106	113
189	201	195	195	207	205
162	169	190	184	189	179
151	155	163	167	176	170
176	180	183	173	185	169
147	148	150	144	166	152
241	244	269	287	263	250
197	195	202	191	200	192
288	295	267	283	289	297
310	319	320	308	322	325
207	215	221	215	215	221

Tabelle 4

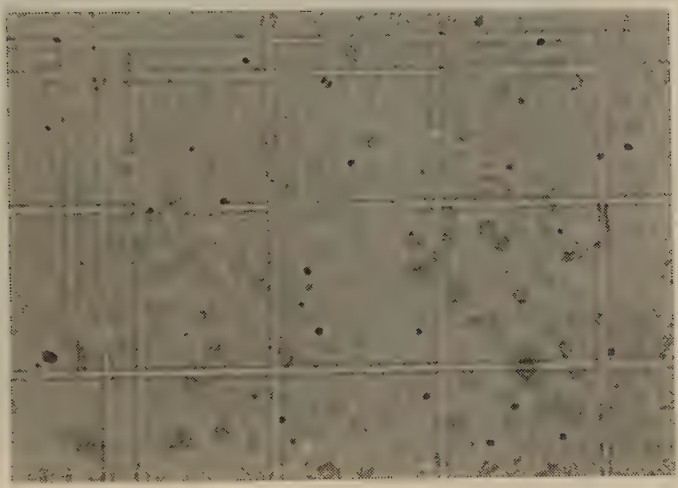
Thrombopenien

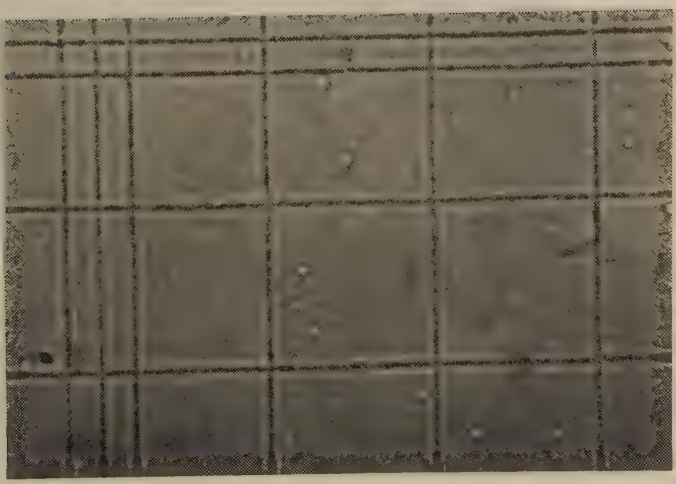
Fall 1	Datum	Procain		Thrombofix		Thrombosol	
	12.1.	53	61	42	45	60	67
	13.1.	53	54	45	47	69	75
	14.1.	58	66	44	42	61	62
	17.1.	59	63	46	48	61	59
	27.1.	61	60	41	39	63	59
	11.2.	14	15	14	16	18	17
	14.2.	52	58	41	39	63	61
Fall 2	12.1.	11	12	11	12	13	13
	13.1.	14	15	13	15	14	16
	14.1.	13	15	13	11	15	14
	17.1.	5	7	6	8	7	8
	19.1.	8	7	7	8	9	8
	24.1.	14	13	14	12	14	15
	26.1.	15	13	17	19	16	18
	27.1.	10	12	12	12	12	11
	2.2.	9	10	10	9	11	11
	3.2.	9	9	10	8	10	10
	7.2.	11	11	13	12	13	11
	9.2.	11	10	12	11	10	11
	11.2.	45	40	42	44	43	41
	14.2.	16	16	15	17	15	13
	16.2.	13	11	11,5	13	11,5	12

Mikroskopische Aufnahmen

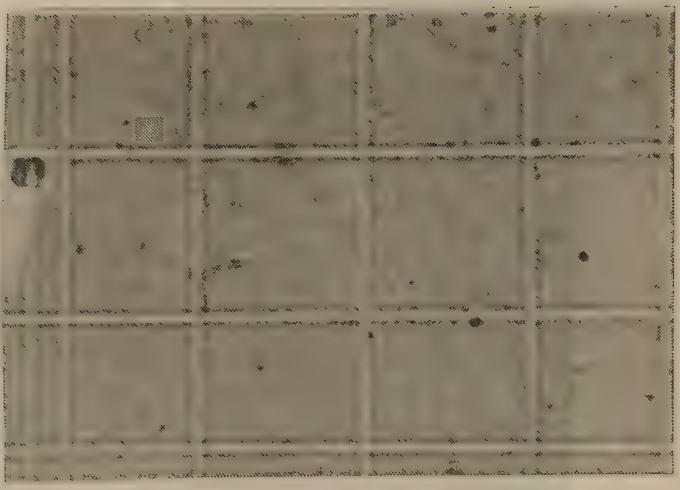
Von jeder Verdünnungslösung wurden 2 Aufnahmen vom gleichen Gesichtsfeld gemacht. Die erste Aufnahme zeigt die Thrombocyten jeweils bei der Einstellung, bei der sie als schwarze Punkte erscheinen, das zweite Foto zeigt die Einstellung, bei der sich die Blutplättchen als leuchtende Scheibchen darstellen. Die Gesamtvergrößerung der Aufnahmen beträgt ungefähr 600-fach.

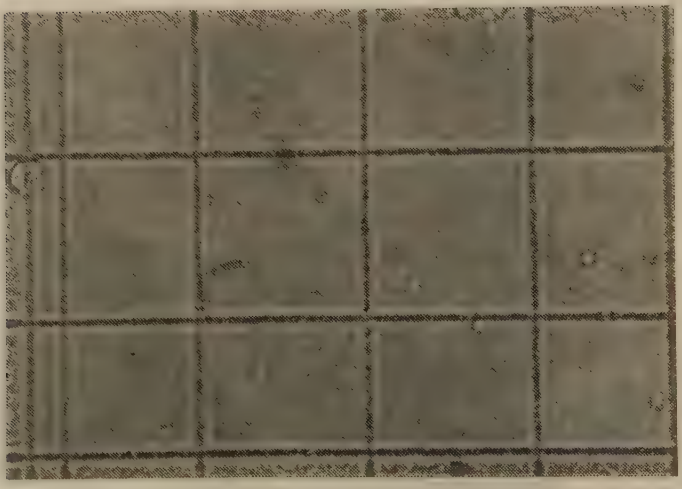
Procain



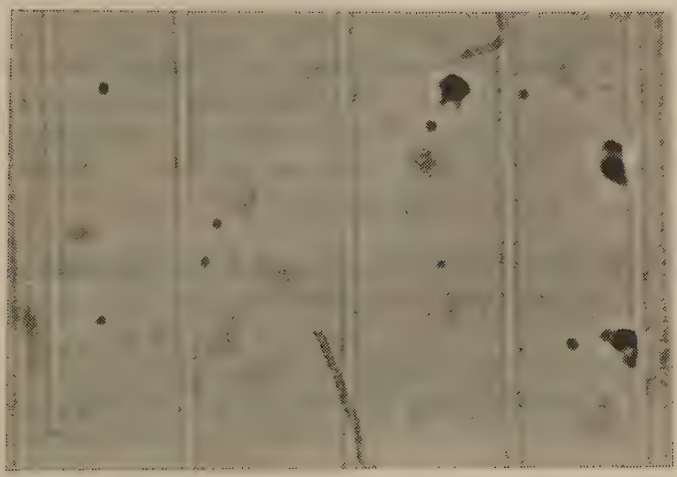


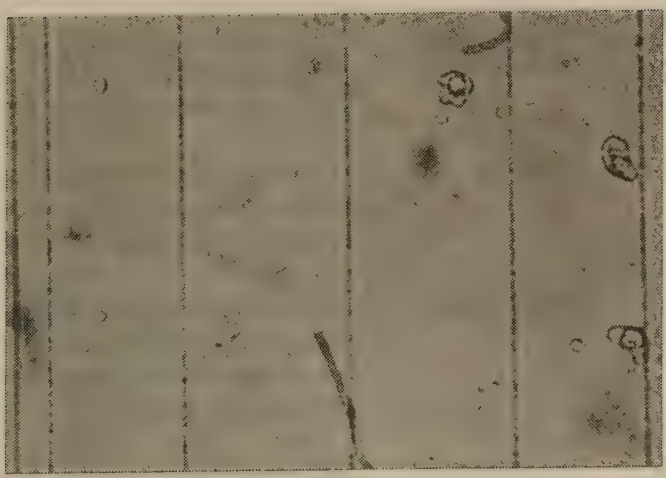
Thrombofix





Thrombosol





Literaturverzeichnis

1 AHLHORN J. Studien zur direkten phasenoptischen Thrombocytenzählung. Zf. klin. Med. 153, 154 (1955)

2 BERGHOFF A., GLATZEL H. Experimentelle Beiträge zur Bestimmung der leistungsfähigkeit gerinnungsphysiologischer Untersuchungsmethoden I. Thromb. diath. haem. 132 (1963)

3 BRECHER G., CRONKITE E.P. Morphology and enumeration of human blood platelets. J. appl. Phys. 3, 365 (1950)

4 DERLATH S. Die direkte phasenoptische Thrombocyten- und Reticulocytenzählung. Ärztl. Forsch. 10, 552 (1956)

5 DEUTSCH E., GEYER G. Laboratoriumsdiagnostik.(Hartmann Berlin 1975)

6 NACHTIGALL C. Vergleichende Thrombocytenzählung. Ärztl. W.-schr. 11, 76 (1956)

7 OHLER W.G.A. Leitfaden der Blutstillungs- und Blutgerinnungsstörungen.(Witzstrock, Baden-Baden, Brüssel 1971)

8 OSTEN W. Thrombocytenzählung unter Verwendung von Sequestrennatrium und hypotoner Kokainlösung. Rönt. Lab. Prax. 6, 91 (1959)

9 PERLICK E. Gerinnungslaboratorium in Klinik

und Praxis. (Thieme, Leipzig)

10 RICK W. Klinische Chemie und Mikroskopie. (Springer, Berlin 1974)

11 SIERING H. Phasenoptische Thrombocytenzählung. Yok. Med. Bul. 7, 79 (1956)

12 ÜBERLA K. Biomathematik, Erläuterungen und Lernhilfen zum Gegenstandskatalog. (Krug, München 1975)

13 VINAZZER H. Gerinnungsstörungen in der Praxis. (Fischer, Stuttgart 1972)

14 WEISBERG G. Fehleranalyse und Optimierung der Thrombocytenzählung. Diss. Köln (1973)

BMDP2V - ANALYSIS OF VARIANCE AND COVARIANCE INCLUDING REPEATED MEASURES
HEALTH SCIENCES COMPUTING FACILITY
UNIVERSITY OF CALIFORNIA, LOS ANGELES

PROGRAM REVISED FEBRUARY 19
MANUAL DATE -- 1973

IN THIS VERSION OF BMDP2V
-- WHEN CODES OR CUTPOINTS ARE NOT SPECIFIED, THE MEANS AND STANDARD DEVIATIONS WILL BE MORE READABLE
IF THE DATA IS ORDERED ON THE GROUPING VARIABLES.

PROGRAM CONTROL INFORMATION

```
      PROBLEM     TITLE = 'THROMBOZYTENZAEHLUNG',/
      INPUT       VARIABLES = 6,
                  FORMAT IS'(3X,6F3.0)',
                  CASES = 170,
                  UNIT =30,/
      VARIABLE    NAMES ARE 'PROC1','PROC2','THFIX1','THFIX2','THSOL1',
                    'THSOL2',/
      DESIGN  LEVEL=3,2,  DEPEND = 1 TO 6,/
      END/
```

PROBLEM TITLE . . . . . .THROMBOZYTENZAEHLUNG

NUMBER OF VARIABLES TO READ IN.	6
NUMBER OF VARIABLES ADDED BY TRANSFORMATIONS. .	0
TOTAL NUMBER OF VARIABLES	6
NUMBER OF CASES TO READ IN.	170
CASE LABELING VARIABLES	
LIMITS AND MISSING VALUE CHECKED BEFORE TRANSFORMATIONS	
INPUT UNIT NUMBER	30
REWIND INPUT UNIT PRIOR TO READING. . DATA. . .	YES

INPUT FORMAT
(3X,6F3.0)

VARIABLES TO BE USED

1	PROC1	2	PROC2	3	THFIX1	4	THFIX2	5	THSOL1
6	THSOL2								

DESIGN SPECIFICATIONS

DEPEND =	1	2	3	4	5	6
LEVEL =	3	2				

CELL MEANS FOR 1-ST DEPENDENT VARIABLE

	R	S		MARGINAL
PROC1	1	1	165,99411	165,99411
PROC2	1	2	166,14705	166,14705
THFIX1	2	1	163,20587	163,20587
THFIX2	2	2	163,75293	163,75293
THSOL1	3	1	172,37057	172,87057
THSOL2	3	2	173,03529	173,03529
	MARGINAL		167,50098	167,50098
	COUNT		170	170

STANDARD DEVIATIONS FOR 1-ST DEPENDENT VARIABLE

	R	S	
PROC1	1	1	56,09433
PROC2	1	2	54,87358
THFIX1	2	1	53,82431
THFIX2	2	2	54,93633
THSOL1	3	1	59,65599
THSOL2	3	2	58,87570

ANALYSIS OF VARIANCE FOR 1-ST DEPENDENT VARIABLE

SOURCE	SUM OF SQUARES	DEGREES OF FREEDOM	MEAN SQUARE	F	PROB. F EXCEEDED
MEAN	28617232,00000	1	28617232,00000	1115,78070	0,000
ERROR	4334469,00000	169	25647,71800		
R	16300,18700	2	8150,09370	29,12273	0,000
ERROR	94590,43700	338	279,85327		
S	21,18359	1	21,18359	0,22523	0,636
ERROR	15895,32800	169	94,05519		

Lebenslauf

Familienname	Rödel
Vornamen	Eberhard Karl Ehrhard
Geburtstag	17. 07. 1954
Geburtsort	Coburg
Eltern	Richard Rödel, Diplom-Ingenieur Margarete Rödel, geb. Fenzlein, Oberstudienrätin
Schule	Volksschule in Hof/Saale 1960-1964 neusprachliches Gymnasium in Hof/Saale 1964-1973 Abitur 1973
Studium	Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität München 1973-1979 Staatsexamen in München 1979 Approbation als Arzt in München am 26. 11. 1979

Lebenslauf

Familienname	Rödel
Vornamen	Eberhard Karl Ehrhard
Geburtstag	17. 07. 1954
Geburtsort	Coburg
Eltern	Richard Rödel, Diplom-Ingenieur Margarete Rödel, geb. Fenzlein, Oberstudienrätin
Schule	Volksschule in Hof/Saale 1960-1964 neusprachliches Gymnasium in Hof/Saale 1964-1973 Abitur 1973
Studium	Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität München 1973-1979 Staatsexamen in München 1979 Approbation als Arzt in München am 26. 11. 1979